

○ 刘翠琼 尹伟伦 夏新莉 著



ZHONGGUO SHAJI HE BEIMEI HONGSHAN

中国沙棘和北美红杉

体细胞胚胎诱导及其组织细胞学的研究

TIXIBAO PEITAI YUDDAO JIQI ZUZHIXIBAOXUE DE YANJIU

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

中国环境科学出版社

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

中国沙棘和北美红杉体细胞胚胎 诱导及其组织细胞学的研究

刘翠琼 尹伟伦 夏新莉 著

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

中国沙棘和北美红杉体细胞胚胎诱导及其组织细胞学
的研究/刘翠琼等著. —北京: 中国环境科学出版社, 2008.9
(北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书. 第5辑)
ISBN 978-7-80209-810-7

I. 中… II. 刘… III. ①沙棘—胚胎—诱导—研
究—中国②北美红杉—胚胎—诱导—研究③沙棘—组织
细胞—研究—中国④北美红杉—组织细胞—研究
IV. S793.6 S791.33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 143830 号

责任编辑 周煜
责任校对 扣志红
封面设计 龙文视觉

出版发行 中国环境科学出版社
(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.cn>
联系电话: 010-67112765 (总编室)
发行热线: 010-67125803

印 刷 北京市联华印刷厂
经 销 各地新华书店
版 次 2009 年 4 月第 1 版
印 次 2009 年 4 月第 1 次印刷
开 本 850×1168 1/32
印 张 6.75
字 数 170 千字
定 价 25.00 元

【版权所有, 未经许可请勿翻印、转载, 侵权必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

编辑委员会

主任：尹伟伦

副主任：马履一

委员（按姓氏笔画排序）：

刘俊昌 余新晓 吴 斌 张启翔 李凤兰

李俊清 俞国胜 赵广杰 骆有庆 贾黎明

续九如 蒋湘宁 翟明普

秘书：王兰珍

序 言

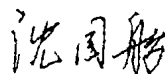
科学技术水平是知识经济时代评价一个国家国力的重要标准。科技水平高则国力强盛，无论在政治、经济、文化、信息、军事诸方面均会占据优势；而科技水平低则国力弱，就赶不上时代的步伐，就会在竞争日趋激烈的国际大舞台上处于劣势。江泽民同志在庆祝北大建校 100 周年大会上也强调指出：“当今世界，科学技术突飞猛进，知识经济已见端倪，国力竞争日益激烈。”因此，提高科学技术水平，提高科技创新能力已为世界各国寻求高速发展时所共识。我国将“科教兴国”作为国策也表明了政府对提高科技水平的决心。博士研究生朝气蓬勃，正处于创新思维能力最为活跃的黄金年龄，同时也是我国许多重要科研项目中的中坚力量，他们科研成果水平的高低在一定程度上影响着所高校、一个科研院所乃至我国科研的整体水平。国务院学位委员会每年一度的“全国百篇优秀博士论文”评选工作是对我国博士研究生科研水平的集体检阅，已被看做是博士研究生的最高荣誉，对激励博士勇攀科技高峰起到了重要的促进作用。北京林业大学不仅积极参加“全国百篇优秀博士论文”的推荐工作，还以此为契机每年评选出三篇校级优秀博士论文并设立专项基金全额资助论文以丛书形式出版，这是一项非常有意义的工作，对推动学校科研水平的提高将发挥重要作用。

从人才培养的角度来看，如何提高博士研究生的创新思维能力和综合素质，高质量地向社会输送人才备受世人关注。提高培养质量的措施很多，但在培养中引入激励机制，评选优秀博士论文并资助出版，不失为一种好方法。博士生和导师可据此证明自己的学术能力，确立自己的学术地位；也可激励新入学的研究生尽早树立目标，从而在培养的全过程严格要求自己，提高自身的

素质。

因学科的特殊性，要想出色完成林业大学的博士论文有许多其他学科所不会遇到的困难，如研究周期长，野外条件难于严格控制，工作条件难苦等。非常欣慰的是北京林业大学的博士生们不仅克服困难完成了学业，而且已经有人中选“全国百篇优秀博士论文”。而该丛书资助出版的“校级优秀博士论文”所涉及的研究领域、研究成果的水平也属博士论文中的佼佼者，令我欣喜。对这些博士生所取得的成果我表示祝贺，同时也希望他们以及今后的同学们再接再厉，取得更好的成绩报效祖国。

中国工程院副院长、院士



2002年8月10日

目 录

第一篇 中国沙棘体细胞胚胎诱导及其组织细胞学研究

引言	3
1 文献综述	5
1.1 木本植物体细胞胚胎发生的研究进展	5
1.1.1 体细胞胚胎发生的特点和意义	5
1.1.2 木本植物体细胞胚胎发生的研究现状	6
1.1.3 影响木本植物体细胞胚胎发生及植株再生的因素 ...	7
1.2 沙棘概述	17
1.2.1 分类、生物学特性、种质资源及其地理分布	17
1.2.2 营养成分和利用价值	18
1.3 沙棘苗木繁殖技术研究现状	19
1.3.1 有性繁殖	19
1.3.2 无性繁殖	21
1.4 本篇研究的目的和意义	32
1.5 技术路线	33
1.6 论文的组成	33
2 中国沙棘茎尖的离体快速繁殖	35
2.1 材料与方法	35
2.1.1 材料	35
2.1.2 无菌苗的培养	35

2.1.3 茎尖的增殖	36
2.1.4 试管苗的生根	36
2.1.5 小植株的移栽	37
2.1.6 培养条件	38
2.1.7 试验数据的调查与统计分析	38
2.2 结果与分析	39
2.2.1 无菌苗的培养	39
2.2.2 茎尖的增殖	42
2.2.3 壮苗培养	47
2.2.4 试管苗的生根	47
2.2.5 试管苗的移栽	54
2.3 小结	55
2.4 讨论	55
2.4.1 不同基本培养基对试管苗形态建成的影响	55
2.4.2 不同植物生长调节剂对试管苗形态建成的影响	56
2.4.3 活性炭对生根的影响	57
2.4.4 试管苗的移栽成活率	58
3 中国沙棘体细胞胚胎的诱导与植株再生	59
3.1 材料与方法	59
3.1.1 试验材料	59
3.1.2 方法	59
3.1.3 体细胞胚胎的诱导与增殖 (振荡培养)	62
3.1.4 白砂糖浓度对小植株再生的影响	63
3.1.5 小植株的炼苗与移栽	63
3.2 结果与分析	63
3.2.1 外植体的培养动态	63
3.2.2 体细胞胚胎的诱导与小植株再生 (固体培养)	67
3.2.3 体细胞胚胎的诱导与增殖 (振荡培养)	80

3.2.4 不同白砂糖浓度对植株成苗率的影响.....	80
3.2.5 体细胞胚胎小植株的炼苗与移栽成活率.....	84
3.3 小结.....	85
3.4 讨论.....	86
3.4.1 不同基本培养基对体细胞胚胎诱导和植株再生的影响.....	86
3.4.2 不同植物生长调节剂对体细胞胚胎诱导和植株再生的影响.....	87
3.4.3 不同糖类和浓度对体细胞胚胎诱导和植株再生的影响.....	88
3.4.4 不同外植体种类对体细胞胚胎诱导和植株再生的影响.....	89
3.4.5 不同接种方式对体细胞胚胎诱导和植株再生的影响.....	90
3.4.6 不同培养方式对体细胞胚胎诱导和增殖的影响.....	90
3.4.7 体细胞胚胎诱导中的畸形胚状体问题.....	91
4 中国沙棘体细胞胚胎发生过程中的组织细胞学研究.....	93
4.1 材料与方法.....	93
4.1.1 组织结构观察.....	93
4.1.2 淀粉和蛋白质观察.....	96
4.1.3 扫描电镜 (SEM) 观察.....	98
4.1.4 透射电镜 (TEM) 观察.....	100
4.1.5 蛋白质表达初探.....	102
4.2 结果与分析.....	110
4.2.1 组织结构观察.....	110
4.2.2 淀粉粒和蛋白质的观察.....	114
4.2.3 扫描电镜 (SEM) 观察.....	118
4.2.4 透射电镜 (TEM) 观察.....	121

4.2.5 蛋白质表达初探	124
4.3 小结	128
4.4 讨论	130
4.4.1 体细胞胚胎发生过程中组织结构的变化	130
4.4.2 体细胞胚胎发生过程中淀粉粒含量的变化	132
4.4.3 体细胞胚胎发生过程中蛋白质含量的变化	133
4.4.4 体细胞胚胎发生过程中扫描结构和超微结构 的变化	134
4.4.5 体细胞胚胎发生过程中的表达蛋白	135
5 结论	137
5.1 中国沙棘茎尖的离体快速繁殖	137
5.2 中国沙棘体细胞胚胎的诱导与植株再生	138
5.3 中国沙棘体细胞胚胎发生过程中的组织细胞学研究	139
6 展望	141
6.1 创新点	141
6.2 进一步研究的内容	141

第二篇 北美红杉体细胞胚胎的诱导及其组织细胞学的研究

引言	147
1 文献综述	149
1.1 北美红杉概述	149
1.2 北美红杉苗木繁殖的研究现状	150
1.2.1 种子繁殖	150
1.2.2 无性繁殖	151
1.2.3 苗木繁殖中存在的问题	155

1.3 本篇研究的目的是和意义	155
1.4 技术路线	156
1.5 论文的组成	156
2 北美红杉不定芽和体细胞胚胎的诱导	157
2.1 材料与方法	157
2.1.1 材料	157
2.1.2 方法	157
2.2 结果与分析	159
2.2.1 胚性愈伤组织、不定芽和体细胞胚胎的诱导	159
2.2.2 胚性愈伤组织上胚状体的形成	166
2.2.3 植株的生根	168
2.3 小结	169
2.4 讨论	169
2.4.1 体细胞胚胎产生的途径	169
2.4.2 不定芽和体细胞胚胎的诱导	170
3 北美红杉体细胞胚胎发生过程中的组织细胞学	171
3.1 材料与方法	171
3.1.1 组织结构观察	171
3.1.2 淀粉粒和蛋白质观察	171
3.2 结果与分析	172
3.2.1 组织结构的变化	172
3.2.2 淀粉与蛋白质的变化	173
3.3 小结	174
3.4 讨论	175
参考文献	176
缩略词表	200
致谢	202

中国沙棘体细胞胚胎诱导
及其组织细胞学研究

第
一
篇

引言

我国是一个干旱、半干旱地占国土面积比例很大的国家，占国土面积 50%以上，生态环境脆弱、荒漠化、沙化程度日益加剧，已经成为我国面临的重大环境问题（胡小文等，2004）。抑制土地沙漠化的一条重要途径就是恢复植被，提高植被覆盖率，减少地表蒸发量（祝克列，2001）。而沙棘（*Hippophae rhamnoides* L.）耐寒、抗旱、耐土地贫瘠，是一种广泛分布于欧亚大陆、生态适应性很强的温带落叶灌木或小乔木，其根、茎、叶、果都具有很高的营养利用价值和神奇的医药、保健功能，具有保持水土、治沙改土的生态环境功能，同时还可用作燃料、饲料、食品，具有良好的社会效益、经济效益和生态效益（张富等，2005；张二芳，2005）。

沙棘以其自身优良的生物学、生态学特性及其潜在的经济开发价值，受到社会各界的广泛关注。特别是随着“西部大开发”战略的实施，沙棘产业化进程的加快以及退化生态系统恢复和荒漠化防治等一些重大项目的启动，使得这一神奇的灌木树种倍受青睐。在这种形势下，沙棘种苗问题就成了人们普遍关注的焦点。于是，各种苗木繁育技术成果纷纷走向实用化，如播种育苗、根蘖育苗、压条育苗、嫁接育苗、扦插育苗、微型育苗（组培）等。但由于沙棘为雌雄异株植物，种子繁殖的后代容易发生变异，且幼苗性别难以辨别，只能用于生态林的建设。而经营性造林中采用的幼苗扦插、嫁接及根蘖进行无性繁殖，存在着成苗率低、速度慢等缺点，难以适应市场对苗木的需求（谭树人等，1995；黄茜，1997；徐虹等，1999）；组织培养虽然取得了比较长足的进

展,但仍存在着外植体褐变严重,成苗率、繁殖系数、生根率以及移栽成活率都偏低等问题,要将其应用于沙棘苗的快速繁殖和工厂化生产,还有许多问题尚待进一步的研究(康冰等,2002;刘延吉,2004)。因此,本篇在前人研究的基础上,在国家林业局重点项目——刺槐沙棘等林木抗逆性育种及区域化试验(2005-01)的大力资助下,进一步探讨了不同基本培养基、植物生长调节剂等因素对中国沙棘(*H. rhamnoides* L. subsp. *sinensis* Rousi)茎尖离体增殖和生根的影响,建立起比较稳定的离体快速繁殖体系,以期沙棘其他优良种苗的快速繁殖推广提供技术支持。

目前,有关体细胞胚胎诱导及其体胚发生机制的研究报道多见于其他植物,在沙棘中还未见真正成功的报道,极大地影响了沙棘优良品种在生产中的广泛应用。为此,本研究在中国沙棘茎尖离体快繁体系建立的基础上,采用固体培养和液体振荡培养两种培养方式,进行了体细胞胚胎诱导与植株再生,为沙棘其他优良品种的体细胞胚胎发生提供有益的理论和技术参考,并为人工种子研究、突变体筛选和遗传转化等提供良好的无性繁殖的实验体系,这对于促进我国沙棘胚状体在新品种培育中的应用和沙棘种苗传统生产方式的变革具有重要意义;同时在体细胞胚胎发生的基础上,通过组织细胞学技术,初步探讨了淀粉粒、蛋白质这两种生物大分子在体胚发生过程中的动态变化,这对于揭示细胞分化、发育、形态发生与合子胚发育等理论问题具有十分重要的意义,并为进一步利用分子生物学方法研究调控胚胎发育过程奠定了一定的基础。

1 文献综述

1.1 木本植物体细胞胚胎发生的研究进展

1.1.1 体细胞胚胎发生的特点和意义

植物的体细胞胚胎发生 (somatic embryogenesis, SE) 是指双倍体或单倍体的体细胞 (非合子细胞) 在特定条件下, 未经过细胞融合而通过与合子胚发生类似的途径发育出新个体的过程 (沈海龙, 2005)。与器官发生途径相比, 具有 4 个方面的显著特点: ① 具有两极性。体细胞一旦形成后, 大多可生长为小植株, 成苗率高; ② 存在生理隔离 (physiological isolation); ③ 遗传性相对较高; ④ 重演受精卵形态发生的特性 (崔凯荣、戴若兰, 2000)。当体胚在培养条件适宜时还能反复产生次生胚而形成体胚无性系, 这种体胚发生体系为植物的离体繁殖提供了新的途径 (汤浩茹等, 2000)。体细胞胚胎发生在很多领域中具有广泛的应用: ① 理论研究上, 为植物细胞分化、全能性表达过程和机理等重大理论问题的研究提供了理想的试验体系; ② 人工种子作为建立在体细胞胚胎发生应用基础研究之上的高新技术, 是促进离体快速繁殖、实现田间和温室栽培的重要途径; ③ 体细胞胚或胚性愈伤可在适宜条件下长期保存, 从而实现种质资源保存, 为挽救濒危植物提供了可能; ④ 体细胞胚胎再生系统遗传上稳定、再生频率高, 是多数植物最理想的转化受体系统; ⑤ 间接体细胞胚发生过程中众多体细胞无性系变易可为突变体

的筛选提供新的来源：⑥以胚无性系细胞为材料制备原生质体为下游工作如细胞分化和植株再生等奠定了基础（翟晓巧等，2004）。

1.1.2 木本植物体细胞胚胎发生的研究现状

林木的体胚发生研究起始于 20 世纪 70 年代后期，到 80 年代后期 90 年代初才得到迅速的发展，并获得了极大的成功。迄今为止，全世界已对 50 多科 180 多种木本植物成功地进行了体细胞胚胎发生诱导并培育出了再生植株。木本被子植物体细胞胚胎发生的首例报道是在对檀香木（*Santalum album* L.）的研究中取得的，而欧洲云杉（*Picea abies* Karst.）和欧洲落叶松（*Larix decidua* Mill.）则是木本裸子植物的首例。据初步统计，目前已从冷杉属（*Abies*）、落叶松属（*Larix*）、松属（*Pinus*）、云杉属（*Picea*）、黄杉属（*Pseudotsuga*）和北美红杉属（*Sequoia*）等的 20 多种针叶树经外植体培养产生了体细胞胚。其中，美国的惠豪公司、国际纸业公司、维斯瓦库公司、加拿大的一些公司、新西兰林业研究中心等已分别将火炬松（*P. taeda*）、花旗松（*P. menziesii*）和辐射松（*P. radiata*）等重要树种的体细胞胚诱导和植株再生较大规模应用于生产实践。新西兰现已形成年产 200 万株辐射松（*P. radiata*）细胞植株的能力（唐巍等，1996；陈金慧等，2000；曾燕如、方伟，2003；贾彩凤等，2004）。

在木本被子植物的体细胞胚胎发生研究中，已经从 46 科 95 属大约 140 多个树种的组织培养中观察到体细胞胚或诱导出再生植株。其中木本双子叶植物约有 43 科 85 属 120 多种，主要有豆科（*Fabaceae*）、蔷薇科（*Rosaceae*）、芸香科（*Rutaceae*）及桃金娘科（*Myrtaceae*）等。单子叶植物多为草本。禾本科（*Gramineae*）、芭蕉科（*Musaceae*）和棕榈科（*Palmae*）3 科约 10 属木本单子叶植物进行了体细胞胚胎发生的研究（贾彩凤等，2004）。